

愛文芒果 (*Mangifera indica* L. cv. Irwin) 類胡蘿蔔素 生合成基因在果實發育時期之基因表現分析與選殖¹

李文立² 邱國棟² 林榮貴² 陳福旗^{3,4}

摘 要

李文立、邱國棟、林榮貴、陳福旗。愛文芒果 (*Mangifera indica* L. cv. Irwin) 類胡蘿蔔素生合成基因在果實發育時期之基因表現分析與選殖。台灣農業研究 57:213–229。

本研究利用快速增殖 cDNA (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技術，從愛文芒果果皮之訊息 RNA (mRNA) 中選殖類胡蘿蔔素 (phytoene desaturase, PDS) 基因之互補 DNA (cDNA) 以瞭解其果實發育期間色素基因表現情形。*PDS* 基因全長為 1,882 bp，包含一個長達 1,644 bp 的解讀框架 (open reading frame, ORF) 可轉譯成 548 個胺基酸，5' 及 3' 端未轉譯區 (untranslated region, UTR) 分別為 36 bp 及 202 bp，由序列比對分析結果顯示，該基因的胺基酸序列與其他植物物種具有 50.0–74.1% 的相似性。*PDS* 基因經逆轉錄及 DNA 擴增後利用管家基因 (housekeeping gene) *actin* 之相對表現量，偵測其在不同果實發育時期之相對表現量，顯示愛文芒果 *PDS* 基因在果實發育期間為穩定表現之基因，*PDS* 基因從幼果期至黃熟果均有表現，與 *actin* 基因的相對表現量在幼果期 (stage 1) 最高，隨著果實發育，該基因的表現量呈現降低的趨勢。而果實在成熟過程中，總胡蘿蔔素的含量會在果實達到生理成熟期後才會快速地大量增加，而該基因的表現量卻未隨總胡蘿蔔素的增加而增加，顯示在果實後熟過程中，*PDS* 基因並未對類胡蘿蔔素生成有直接的影響。由於在果實發育過程中，芒果 *PDS* 基因的表現量呈現下降之趨勢，該基因的表現模式應為負調節 (down-regulated) 方式。

關鍵詞：芒果、類胡蘿蔔素、八氫茄紅素去氫酶、基因選殖。

前 言

類胡蘿蔔素 (carotenoids) 廣泛分布於生物體，包含所有利用葉綠素進行光合成的生物體、某些非光合作用的細菌及多種真菌類。就光合成的植物而言，類胡蘿蔔素是必需的物質，它具有抗氧

-
1. 行政院農業委員會農業試驗所農業研究報告第 2329 號。接受日期：97 年 9 月 10 日。
 2. 本所鳳山熱帶園藝試驗分所助理研究員、助理研究員及副研究員。台灣 高雄縣 鳳山市。
 3. 屏東科技大學植物科學研究所教授。台灣 屏東縣。
 4. 通訊作者，電子郵件：fchen@mail.npust.edu.tw；傳真機：(08)7740371。

化的功能，可保護處在單一氧分子、過氧化狀態或是光氧化 (photo-oxidation) 的葉綠素，而且類胡蘿蔔素也是植物相當重要的色素物質，雖然在自然界中提供各種色彩的物質以類黃酮 (flavonoids) 化合物為主，但類胡蘿蔔素亦提供紅、黃、橙等色彩，以吸引動物幫助植物花粉及種子的傳播 (Li *et al.* 2001)。此外，類胡蘿蔔素為人類維他命 A 的前驅物質，對人類的健康具有相當重要的地位，國際上對此議題之研究報告頗多。類胡蘿蔔素在畜牧生產上同樣具有重要地位，常做為畜產動物飼料的重要營養添加物，以幫助畜產動物增進健康及產量，並可做為食品加工業的天然著色劑 (Klauri & Bauernfeind 1981)。一般而言，類胡蘿蔔素由 40 個碳的八氫茄紅素 (phytoene) 起始進行合成，而 phytoene 則由兩個含 20 碳分子的前驅物牻牛兒苗基牻牛兒苗基焦磷酸 (geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP) 產生，由 GGPP 合成為 phytoene 的過程係由八氫茄紅素合成酶 (phytoene synthase) 參與前驅物的合成，之後藉由八氫茄紅素去氫酶 (phytoene desaturase) 的作用加入 6 個額外的雙鍵，產生 ζ -胡蘿蔔素 (ζ -carotene) 及其異構物，在此合成過程中，使無色的 phytoene 轉變為淡黃色的 ζ -carotene，再經過另一次的去飽和 (desaturation) 作用，將黃色的 ζ -carotene 轉換為紅色的茄紅素 (lycopene)，再藉由環化酶 (cyclase) 的作用，即可轉化成 β 胡蘿蔔素 (β -carotene) 而表現出更鮮豔的顏色 (Vishnevetsky 1999; Sandmann 2001)。此外，類胡蘿蔔素與植物荷爾蒙 GA 與 ABA 的生合成有密切相關，係影響植物高矮、形態發育與逆境反應的重要前驅物質 (Sandmann 2001) (圖 1)。

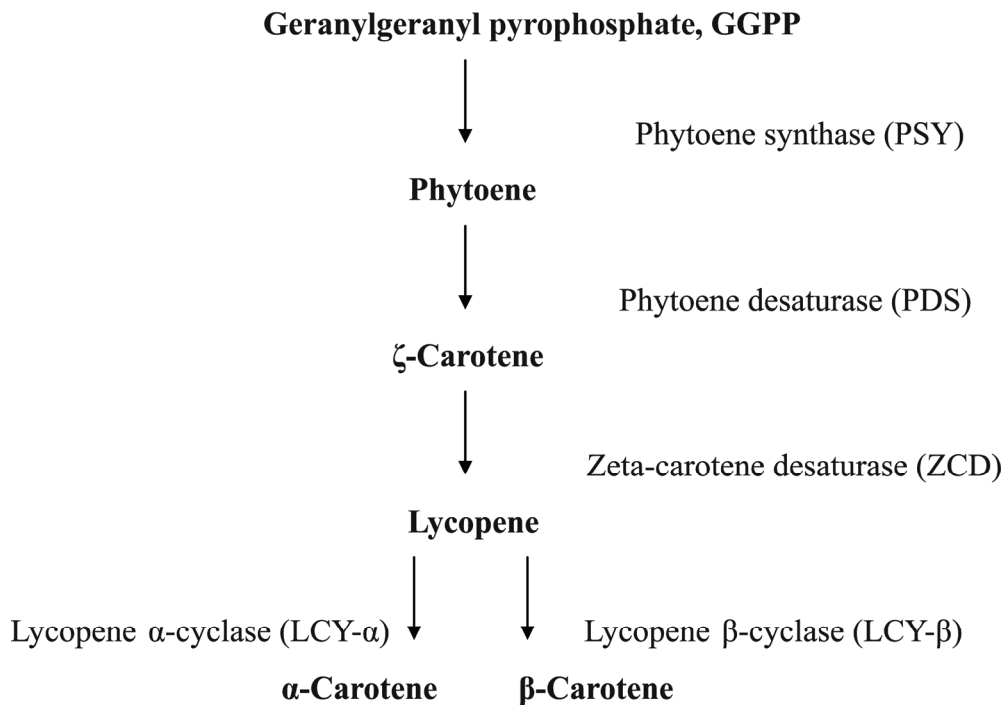


圖 1. 植物類胡蘿蔔素的生合成途徑。

Fig. 1. The carotenoid biosynthetic pathway in plants.

依據農委會統計資料，2007 年台灣芒果的栽培面積廣達 18,375 ha，年產量達 215,291 t，是重要的熱帶經濟果樹之一，特別是台灣南部，台南、高雄及屏東等縣，佔栽培總面積的 95%，目前以愛文 (*Mangifera indica* L. cv. Irwin) 為主要的栽培品種。為了探討類胡蘿蔔素合成相關基因在芒果果實發育過程扮演的角色，並瞭解該基因表現與調節機制，本文以愛文芒果為材料，進行類胡蘿蔔素合成途徑前期重要關鍵酵素 phytoene desaturase (PDS) 基因之選殖與表現之研究。該基因是類胡蘿蔔素合成過程中，將無色的 phytoene 催化成淡黃色 ξ -carotene 的關鍵酵素，本研究選殖愛文芒果 PDS 基因並進行基因結構的解析，探討其在不同果實發育時期的 mRNA 相對表現量變化，期待將來能夠利用該基因做為調控芒果果實中類胡蘿蔔素的生合成量，以改變果肉顏色或增加胡蘿蔔素含量之用。

材料與方法

植物材料

愛文種芒果取自農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所之母樹園，其栽培管理按慣行方法進行。在開花結果後，以果實直徑 3 cm 之幼果做為萃取 RNA 及基因選殖之材料，並依據果實大小，分別以果實直徑 3 cm (stage 1)、果實直徑 5 cm (stage 2)、果實直徑 7 cm (stage 3)、果實直徑 9 cm (stage 4)、果實綠熟 (stage 5) 與果實黃熟期 (stage 6) 等 6 個取樣時期分別取樣，另取樣成熟葉片，做為不同果實發育期間與葉片基因表現量分析之材料 (圖 2)。

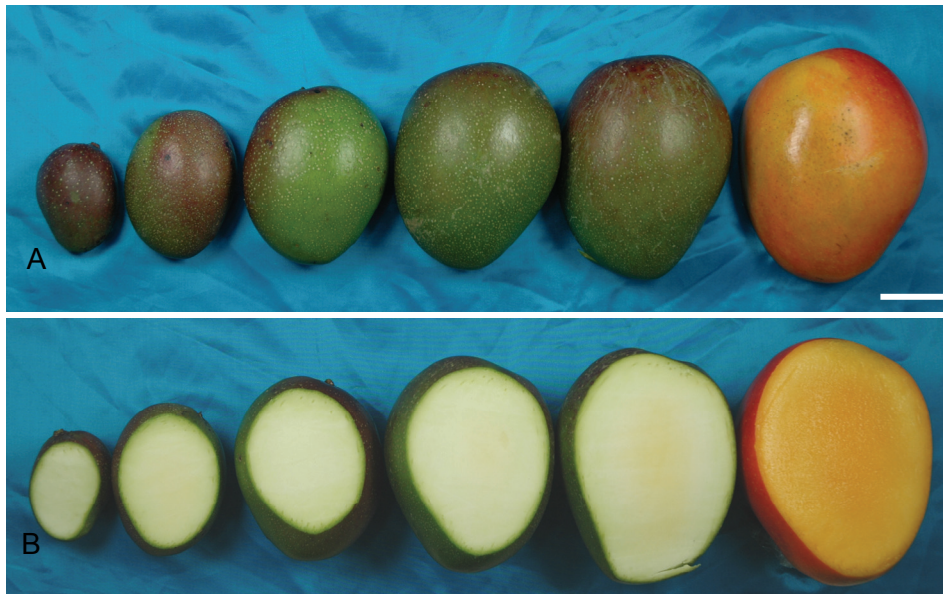


圖 2. 本研究使用之植物材料。A. 不同發育時期的愛文芒果果實外觀；B. 果實內部剖面及果肉顏色。(標尺長度為 3 cm)

Fig. 2. Surface appearance (A) and flesh color (B) of mango fruits, cv. Irwin, at the six development stages (left = stage 1; right = stage 6). Note differences in fruit size and color at different stages. (bar = 3 cm).

PCR 引子之設計與合成

從美國 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 資料庫中收集已經發表之 14 種植物，包含黑藻 (*Hydrilla verticillata*, AAT76434.1)、萬壽菊 (*Tagetes erecta*, AAG10426.1)、葡萄柚 (*Citrus × paradise*, AAK51545.1)、龍膽花 (*Gentiana lutea*, BAB82461.1) 及阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*, AAL15300.1) 等之 PDS 蛋白質序列，利用 Omega 2.0 軟體 (Oxford Molecular Ltd.) 分析不同物種中，該基因之胺基酸保留區域做為合成退化引子 (degenerate primer)，PDS (forward) 及 PDS (reverse)，並依據此引子對複製愛文芒果幼果 PDS 基因之片段 (表 1)。

總量 RNA 之抽取

將約 100 mg 果肉置研鉢內，以適量液態氮使之冷凍，研磨成粉末。加入 TRIZOL (Invitrogen) 1 mL 組織混合均勻，於 4°C 離心 10 mins 後，取上澄液，加入三氯甲烷 (Chloroform, TRIZOL 試劑的 0.5 倍量)，劇烈搖晃，離心管 1 min 後，於室溫靜置 3 mins，4°C 離心後，取上澄液。加入異丙醇 (TRIZOL 試劑的 0.5 倍量)，靜置 10 mins 後，於 4°C 離心 10 mins 後，去上澄液，乾燥後，溶於焦碳酸二乙酯 (DEPC, diethyl pyrocarbonate) 處理過的無菌水，並以光電比色計及瓊脂膠電泳檢測 RNA 的濃度與品質。

cDNAs 之合成

cDNAs 的合成係以 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, California, USA) 進行，方法簡述如下：總量 RNA (0.5 µg) 為模版，SMART II (10 µM) 及 3' CDS (10 µM) 寡核苷酸引子 (oligonucleotide) 各 1 µL，加去離子水調至 5 µL，於 70°C 作用 2 mins 後短暫離心，加入 2 µL 5X first-strand buffer、1 µL DTT mix (20 mM) 與 1 µL dNTP mix (10mM)，以及 200 單位的 Superscript II MMLV，於 42°C 合成單股 cDNAs 1 hr。取 2 µL 的單股 cDNAs 為模版，混以 4 µL 的 5' PCR Primer (10 µM)、10 µL 的 10X Advantage 2 PCR Buffer (Clontech, California, USA)、

表 1. 利用 NCBI 資料庫已發表之數種植物胺基酸序列設計之退化引子及本研究中所使用之引子序列

Table 1. Degenerate primers and other primer pairs were used in this study

Primer Name	Sequences of primers
PDS1 (forward)	5'-TAY GGN YTN GCN GGN YTN TC-3' ^z
PDS2 (reverse)	5'-ARR ATY TTN GCY TTN GAY TG-3'
GSP1 (forward)	5'-GGA ACC ATG CTT CTC CTG GAA G-3'
GSP2 (reverse)	5'-AGC TCC TGT AAA TGG AAT AIT G-3'
SMART II	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3'
3' RACE CDS	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3'
5' RACE CDS	5'-(T) ₂₅ N ₁ N-3'
UPM-long	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT-3'
UPM-short	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
NUP	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3'
<i>actin1</i> (forward)	5'- AGT TGA ACC TCC ACT GAG CAC-3'
<i>actin2</i> (reverse)	5'-GGG CAC CTG AAC CGC TCG GCT CC-3'

^z Y=C,T; W=A,T; D=A,G,T; R=A,G; V=A,C,G; H=A,C and M=A,C.

2 μL dNTP mix (10 mM)、80 及 2 μL Advantage 2 PCR Polymerase Mix (Clontech, California, USA) 等，進行 LD (long distance) PCR 增殖雙股 (double-strand) cDNAs。條件為 95°C 變性 (denaturation) 1 min 及 24 個增幅反應：95°C 變性 5 secs、65°C 鍊合 (annealing) 5 secs 及 68°C 延伸 (extension) 6 mins (ABI GeneAmp PCR system 2700)，最後以 1% 膠體電泳檢測雙股 cDNAs 的品質。

PDS 片段之增殖

根據上述各基因之保守區域設計退化引子以選殖愛文芒果 *PDS* 基因的 cDNA 片段。以 100 ng 雙股 cDNAs 為模版，加入 5 μL 的 2X PCR Mg-free buffer、3 μL MgCl_2 (25 mM)、4 μL dNTPs (2.5 mM)、退化引子 (2.5 μM) 各 4 μL 及 1.25 u 的 *Taq* DNA Polymerase (Promega, USA)，以無菌水調至 50 μL ，混合均勻，進行 PCR。反應條件為 94°C 變性 2 mins 及 36 個循環：94°C 變性 1 min，50°C 鍊合 2 mins 及 72°C 延伸 3 mins；再於 72°C 延伸 10 mins 後，保存於 4°C 直到電泳分析。

PCR 產物之純化

採用 QIAEX[®]II Gel Extraction 試劑 (Qiagen, USA) 純化 PCR 產物。自瓊脂電泳膠體中，以乾淨刀片切取預期分子量之 PCR 產物，每 0.1 g 膠塊，加入 300 μL 的 Buffer QX1。振動懸浮 30 secs，加入 10 μL QIAEXII。50°C 加熱溶解瓊脂膠後，離心 30 secs (13,000 rpm)，移除上清液，以 500 μL Buffer QX1 清洗後，離心 30 secs，去上清液，500 μL Buffer PE 清洗 2 次，風乾至沉澱物呈白色。加 20 μL 無菌水洗提 DNA，供後續實驗之用。

PCR 片段的選殖

以 T4 ligase (pGEM-T Easy vector system, Promega, USA)，連接回收之 PCR 條帶於 pGEM-T Easy 選殖載體，並以熱休克法在 42°C 下轉型至大腸桿菌 JM109 菌系的勝任細胞中，於含 40 mg/mL X-gal 及 IPTG 的 LB/ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 固態培養基，於 37°C 培養 18–20 hrs。待菌落長出後，依藍白篩選法挑選白色菌落進行培養，抽取質體 DNA，以 *EcoRI* 切割或以 PCR 方式確認轉殖成功的殖系 (clone)。

質體的抽取及殖入片段的確認

質體的抽取係以 Viogene 公司的 Plasmid DNA Miniprep System 進行之。挑取單一白色菌落，於含 ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 培養液中，培養 18 hrs 後，依廠商建議之步驟，進行質體萃取。取 10 μL 質體 DNA 溶液，以限制酵素 *EcoRI* 於 37°C 進行酵素剪切 40 mins，以 1% 瓊脂膠電泳篩選含插入片段 DNA 的選殖系。確認之選殖系菌體委託明欣生物科技公司定序 (Mission Bi-tech, Taipei, Taiwan)。

cDNA 片段之序列比對及選殖系保存

將解序完成之 *PDS* 片段選殖系之 cDNA 序列與 NCBI 資料庫以 BLAST Analysis 程式進行比對，確定是否為目標基因片段。已確認之片段可供快速擴增 cDNA 端點 (Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE) PCR 的 5' 及 3' 端專一性引子之設計，並做基因表現分析用。

快速擴增 *PDS* cDNA 端點

專一性引子之設計：依解序完成之 *PDS* 片段選殖系之 cDNA 序列以 Omega 2.0 軟體進行最適引子區域分析設計高專一性引子 (GSP, gene specific primer)，GSP1 (forward) 及 GSP2 (reverse) (表 1)，供 RACE 反應使用。

PDS 5'及 3'端 cDNA 序列之選殖：5'及 3'端 cDNA 序列之選殖採用 Clontech 公司的 SMART™ RACE cDNA Amplification 試劑進行，其步驟概要如下：分別以 3 μ L total RNA 為模版，合成 5'-RACE-Ready cDNA 及 3'-RACE-Ready cDNA。將 3 μ L total RNA、1 μ L 5'-CDS primer 及 1 μ L SMART II A oligo 於 0.2 mL 離心管內混合均勻，短暫離心後；70°C 加熱 2 mins，於冰上冷卻 2 mins，短暫離心；加入 2 μ L 5X first-strand buffer、1 μ L 20 mM DDT、1 μ L 10 mM dNTP Mix 及 1 μ L PowerScript Reverse MMLV Transcriptase，反應體積為 10 μ L，42°C 下 1.5 hrs 後，70°C 加熱 7 mins 終止反應後於 -20°C 凍藏。取 3 μ L total RNA、1 μ L 5'-CDS primer 及 1 μ L 無菌水混合均勻，之後與 5'-RACE-Ready cDNA 合成步驟相同，逆轉錄合成單股 3'-RACE-Ready cDNA，並於 ABI PCR system 2700 以 5 個循環：94°C 變性 10 secs 及 72°C 鍊合及延伸 3 mins，5 個循環：94°C 變性 10 secs、71°C 鍊合 15 secs 及 72°C 延伸 3 mins，最後 20 個循環的 94°C 變性 10 secs、70°C 鍊合 15 secs 及 72°C 延伸 3 mins，完成後置於 4°C 直至電泳分析。若 5'-、3'-RACE PCR 及 3'-RACE Nested PCR 產物與預期產物大小相當，則進行黏接反應、轉型作用、選殖系確認、序列解序及選殖系保存等工作。基因序列之排比以 Omega 2.0 進行，各物種及芒果 *PDS* 基因序列系統分析 (phylogentic analysis) 以 DNASTAR 套裝軟體 (DNASTAR, Inc. Madison, USA) 之 MegAlign 程式進行分析與繪圖。

總量類胡蘿蔔素的測定

果實與葉片總量類胡蘿蔔素之測定依照 Lichtenthaler & Wellburn (1983) 所發表方法，依各成分比例降低至總體積減量為 2 mL 後進行萃取。其大要為秤取樣品後利用液態氮急速冷凍後在研鉢內磨細，以 80%丙酮萃取色素並於 4,500 rpm 離心 5 mins 後，取上清液以 Hitachi U-2000 光譜儀 (spectrophotometer) 測定 $A_{663.6}$ 、 $A_{646.6}$ 及 $A_{440.5}$ 的吸收值，計算葉綠素 a、葉綠素 b 及類胡蘿蔔素總量。

相對定量 RT-PCR

相對定量 RT-PCR 方法參照 Leblanc *et al.* (1999) 發表之相對定量方法，以 *actin* 基因為對照基因，分別進行 RT-PCR 反應後取 12.5 μ L 進行電泳及 EthBr 染色，於紫外燈下照相後利用 AlphaImager 軟體 (Clontech, USA) 進行各個條帶亮度的分析，所得到的數據與 *actin* 基因條帶亮度比較，求得不同果實發育時期與成熟葉片 *PDS* 基因與 *actin* 基因之相對表現量，每個時期均重複進行 3 次 RT-PCR 及定量，所得數值以百分率表示，所得數據以 SigmaPlot 9.0 版軟體求得平均值與標準機差並繪圖。

結 果

愛文芒果 *PDS* cDNA 片段之選殖

芒果全株含有高量的多醣體及酚類化合物，在萃取核酸過程中容易產生褐化物，影響 DNA 或 RNA 的萃取效率，利用 TRIZOL 試劑可以簡單快速的分離到果實的總量 RNA，在仔細的操作下，可避免 DNA 的污染，利用該總量 RNA 進行逆轉錄複製 cDNA 在 22 至 24 次循環及鍊合溫度 68°C 的 PCR 條件下，可以得到高產量且品質佳的 cDNA，供基因分離選殖試驗。

PDS cDNA 片段之增殖係以上述 cDNA 為模版，並依據多種已發表的植物 *PDS* 胺基酸保留區域設計之退化引子 *PDS1* (forward)及 *PDS2* (reverse)，於 55°C 鍊合，32 個增幅反應後，增殖得長約

450 bp 的基因片段，該片段自電泳膠體中分離純化後，以 pGEM-T Easy 載體進行選殖並進行核酸序列解序。該基因片段經與 NCBI 基因庫收錄之核酸序列比對結果顯示，與葡萄柚 (*Citrus × paradise*, AF364515.1) *PDS* 基因核酸序列的一致性 (identity) 達 88%，與水稻 (*Oryza sativa*, AF049356) 比較則有 82% 的一致性，此一結果顯示所選殖之片段確實為芒果 *PDS* 基因部分序列。藉此已選殖獲知的芒果 *PDS* 片段序列進一步設計高專一性的引子，GSP1 (forward) 及 GSP2 (reverse) (表 1)，做為選殖 *PDS* cDNA 3'端及 5'端所需之芒果 *PDS* 基因專一性引子對。

快速複製芒果 *PDS* 基因 cDNA 5'及 3'端點及其全長選殖系

以 GSP2 及 UPM 引子於 70°C 鍊合溫度條件下與 5' RACE-Ready cDNA 模版進行 RACE-PCR，5'端產物約為 900 bp，另以 GSP1 及 UPM 引子與 3' RACE-Ready cDNA 模版鍊合，其 3' RACE 產物約為 1.3 kb，而作為正對照的 GSP1 及 GSP2 引子對，無論在 5'或 3' RACE-Ready cDNA 模版中均產生與預期片段 (400 bp) 大小相符的產物，顯示該兩股 cDNA 均含 *PDS* 基因片段，而負對照中單獨使用任一 GSP 或 UPM 引子在 5'端並未複製出背景條帶，但在 3'端則有一明顯的背景產物，此背景產物因與目標產物分子大小不同，並未造成干擾 (圖 3)。將此 5'端 900 bp 條帶與 3'端 1,300 bp 條帶，分別選殖後進行解序，序列經 DNAStar 軟體拼接去除重複區域後得到 1,882 bp 之愛文芒果 *PDS* 全長 cDNA (圖 4)。並與目前已知的基因序列資料庫比對後，確定為 *PDS* 基因無誤。

愛文芒果 *PDS* 基因之 cDNA 核酸序列與結構

愛文芒果 *PDS* 基因之 cDNA 序列全長為 1,882 bp，編碼區 (coding region) 從 37 bp 處起至 1,680 bp 止，包含一個長達 1,644 bp 的解讀框架 (open reading frame, ORF) 可轉譯成 548 個胺基酸，5'端及 3'端未轉譯區 (untranslated region, UTR) 分別為 36 bp 及 202 bp，由 DNA 序列比對分析結果顯示，該 cDNA 基因 DNA 序列與其他植物物種具有 78-87% 的相似性，其中與柑橘屬的柚子

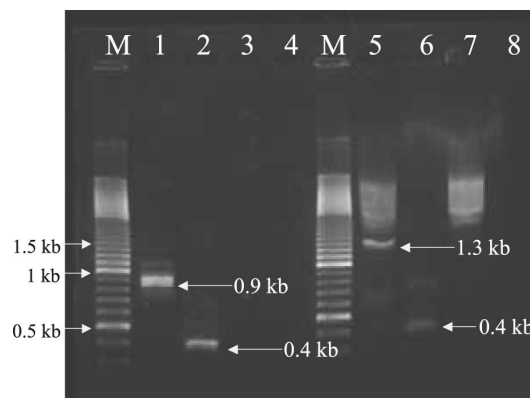


圖 3. 以快速增幅 cDNA 端點方式進行愛文芒果 *PDS* cDNA 選殖之電泳圖。

Fig. 3. The agarose gel of 3' and 5'-RACE-PCR products by using UPM, GSP1 and GSP2 primers. M. DNA ladder; 1. 5' RACE (UPM+GSP2 primer pair); 2. check 1 (GSP1+GSP2 primer pair); 3. check 2 (GSP2 primer only); 4. check 3 (UPM primer only); 5. 3'RACE (UPM+GSP1 primer pair); 6. check 4 (GSP1 +GSP2 primer pair); 7. check 5 (GSP 1 primer only); 8. check 6 (UPM primer only).

(*Citrus maxima*, EU798285.1)、柳橙 (*Citrus sinensis*, AJ319761.1) 及葡萄柚 (*Citrus × paradisi*, AF364515) 等有較高的相似度 (分別為 87%、83%及 83%)，而與阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*, L16237.1) 的相似度較低 (78%)。

愛文芒果與數種植物 PDS 基因之親緣關係

利用 MegAlign 程式中對愛文芒果與 14 種植物的 PDS 胺基酸序列進行叢群分析 (cluster method) (圖 5)，結果顯示愛文芒果 PDS 基因之胺基酸序列與其他植物差異性較大，單獨形成一群。其中與咖啡 (*Coffea canephora*, ABC87739.1) 最為接近，相似度達 74.1%。其他 12 種植物被歸分為一個大群，葡萄柚 (*Citrus × paradise*, AAK51545.1)、杏樹 (*Prunus armeniaca*, AAX33347.1) 及苦瓜 (*Momordica charantia*, AAR86105.1) 在這些物種中較為接近，相似度為 86.1%，被歸類為同一群；萬壽菊 (*Tagetes erecta*, AAG10426.1)、菊花 (*Chrysanthemum × morifolium*, BAE79552.1) 與胡蘿蔔 (*Daucus carota*, ABB52082.1) 為同一群；黑藻 (*Hydrilla verticillata*, AAT76434.1)、番紅花 (*Crocus sativus*, AAO24235.1)、阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*, AAL15300.1) 及水稻 (*Oryza sativa*, AAD02489.1) 為一群，而煙草 (*Nicotiana benthamiana*, ABE99707.1)、馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*, AAS17750.1) 與龍膽花 (*Gentiana lutea*, BAB82461.1) 則單獨成爲一群。芒果 PDS 基因胺基酸序列與其他植物之相似度為 50.0%至 74.1% (表 2)，顯示其基因演化變動較大。比對其高變化區域分別為靠近前端的 38 個胺基酸與末端區域的 140 個胺基酸差異較大外，其餘胺基酸序列則具有較高的保守性 (圖 6)。

-36 CTTCAAAAAGTTCAGATTCTTCACTAACAATAA -1
1 ATGAGCTTCAACTTGAGCITGTGTGGAAGTGCCTTAATGGCGTITTCAGGGAGTGAATTGATGGGCMAGGCCATCAAATTCACGTTAAAGCAACTCCAA 100
M S F N L S L C G S A L M A F O G S E L M G X A I K F H V K A T P R
101 GGAGCGATATAAGCCTTTCAGGTAGCTTGTGTGGACTTCCGAGACGATATTTGATAATACAGCTAATTTCTGGAAAGCTGCTAAGTTGTCTTCTTC 200
S G Y K P L Q V A C V D Y P R P D I D N T A N F L E A A K L S S S
201 CTTTGTGCTTCTGCTGCTCCCAAGCCTTGAAGTTGTAATTCCTGTCAGGTTTGGCTGTTTATCAACTGCAAAATATCTGGCAGATGCAGGC 300
F R A S A R P P K P L K V V I A G A G L A G L S T A K Y I A D A G
301 CACAAACCTTTACTAGAAGCAAGAGATTTCTAGGTGAAAGGTAGCTGCCTGGAAAGACGATGGTGAAGTGGTACTGGTATGAGACAGCCCTCATATAT 400
H K P L L L E A R D V L G K V A A W K D D D G D W Y E T G L H I F
401 TTTTGGGCATACCCAAATGTRCAGAACCTGTTCCGAGAAGTGGTATCAATGACCGATTGCAATGGAAGGAGCACTCAATGATATTTGCAATGCCAAA 500
F G A Y P N V O N L F G E L G I N D R L O W K E H S M I F A M P N
501 CAAGCCAGGAAATCCAGCGATTTGATTTCCAGAAGTCTTCCAGCTCTGTAATGGAATATTTGGCGAAATTTGAAGGAATAATGAAAATGTTA 600
K P R R I P A D L I F O K F L P A P V N G I L G E F E G I M K M L
601 ACTTGGCCGAGAAAGTTCATTTGCTATTTGACCTTCTCCAGCAATGCTTGGTGGCAATCTTATGTTGAAGCCCAAGATGGTTTAACTGTCAAGGAAT 700
T W P E K V K F A I G L L P A M L G G O S Y V E A O D G L T V K E W
701 GGATGATAAAGCAGGAGTACCTGAGCGTGTGACAACAGAGGTGTTTATTTCCGCAATGTCAAAAGGCCACTYTAATTTTATTAACCCATCATCAAA 800
M I K O G V P E R V T T E V F Y F A M S K G H X K F L L N P S S N
801 TTGTCAATGCAATGATATAATTAATGCTTAAAAATCGGATTTCTCCAGGAGAAGCATGGTTCCAGATGGCATTTCTTAGATGGTAGTCCCCAGAGAGA 900
C O M O C I L I A L K S D F F O E K H G S K M A F L D G S P P E R
901 CTTTGTATGCCGATTTGTAATCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAG 1000
L C M P I V N H I O S L G G E V R L N S R I O K I E L N S N G T V K
1001 AGAATTTCTTACTAACCAAGTGGGAAGTGTGAAAGGAGATTTATGATTTGCCACTCCAGTTGACATCCATAAGCTTCTTTTGCCTGAAAACCTGGCA 1100
N F L L T S G E V I E G D V Y V P A T P V D I L K L L L P E N W O
1101 AGAGATGCCGTACTCAAAAAATTTGGAGAAATTTGGTCCGAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAG 1200
E M P Y F K K L E K L V G V P V I N V H I W F D R K L K N T Y D H
1201 CTACTCTCAGCAGAAAGTCTCTTGAGGTGCTGACCGGCTTGACNAATGGYCCGGTAAACATGGTAAAGGAAATTTATTCACAACCCCTTAAACCCAAA 1300
L L F S R S P L L R C C T G L T N G P V T M V R K L F H N P L T O I
1301 TCCCATGGCAAGAGGTTGGGTTTTTGGCCCCGCTCAGAAATGGATTTCTCGGCAAGCGACTCAGAAATAATGGATGCTACAATGAAGGAGCTTGCAA 1400
P C E E V G F F A P R S R N G F S A K R L R N N G C Y N E G A C K
1401 AACCTTTCCCGACGAAATTTCTGCTCATCAAGCAAGCAAAAAATTTGTTACGTATCATGTTGTTTACAGCGGATACACAAAAAGAGTATCTGGCTTCAATGGAAGGTGCA 1500
T L S G R N F C S S K O S K N C Y V S C C Y N A K V C V O D C P K
1501 TTGTGGACCTTGTCTCCCTGCAAGATTCCTCAATAGATGGATTTCTATTTAGCTGGGATACACAAAAAGAGTATCTGGCTTCAATGGAAGGTGCA 1600
L W T L S S P A K I S N R W I L F S W G L H K K T E V S G F N G R C S
1601 GTTGTGCAAGAAAGCTTTGTGTTCAAGCTATTTGACAGACTATGAGGTGCTAGTTGCCGATCAAAAAGGAGAAATTTGCTGAGGCAACATTCGCTAAA 1700
V V R K A L C S S Y C T G L *
1701 TACCCTTAAACAGGCAAGATGGTTGAAAGATTTGATGAGGATTTGTAATGATGGAATATTTATTTTTTCAACTTATAAAAAAGGAAAAATAACTCA 1800
1801 GAATCTTCTATAGTGAATCTATTTCTGCAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA

圖 4. 愛文芒果 PDS 全長 cDNA 及其轉譯後之胺基酸序列。

Fig. 4. PDS cDNA and peptide sequences of *Magifera indica* 'Irwin'. Start codon is in bold.

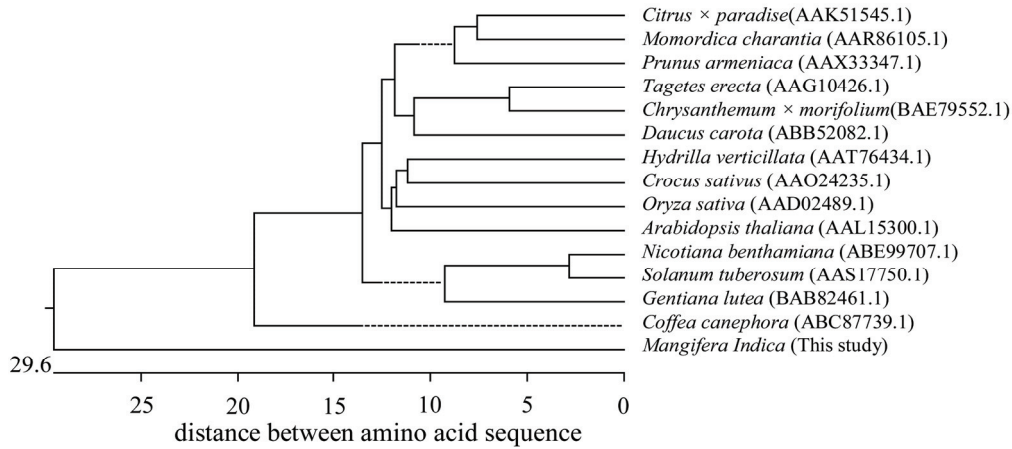


圖 5. 愛文芒果與數種植物 PDS 胺基酸序列之叢群分析圖。橫軸數字表示各分歧點物種胺基酸序列之差異性，虛線 (-) 表示負的分枝長度。

Fig. 5. Phylogenetic relationship of PDS orthologs among *M. indica* 'Irwin' and 14 other plant species based on amino acid sequence. The length of each pair of branches represents the distance between amino acid sequence. Dotted lines (-) indicate a negative branch length.

表 2. 愛文芒果與 14 種已發表植物 PDS 胺基酸序列之相似度比較^z

Table 2. Sequence similarity (%) of Irwin mango (*Mangifera indica*) PDS proteins and other plant species^z

NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	100.0														
2	84.1	100.0													
3	80.8	81.1	100.0												
4	84.4	81.2	80.2	100.0											
5	81.7	78.5	80.2	79.5	100.0										
6	81.5	79.7	79.7	78.3	76.7	100.0									
7	81.9	81.0	81.7	78.8	79.0	79.5	100.0								
8	77.3	79.0	77.3	80.0	78.7	78.1	93.3	100.0							
9	81.5	79.9	80.0	77.6	77.6	78.3	82.1	81.6	100.0						
10	80.3	78.4	81.3	75.7	76.1	77.0	76.1	74.9	75.7	100.0					
11	78.6	77.0	77.1	77.2	78.6	78.4	76.5	76.0	76.3	75.4	100.0				
12	79.3	77.5	77.5	77.0	79.3	77.9	78.4	76.0	75.9	74.2	77.7	100.0			
13	86.6	86.1	86.9	85.0	85.8	84.1	89.1	88.6	89.4	84.4	83.8	84.4	100.0		
14	81.9	79.9	88.2	79.5	78.8	78.3	79.5	79.0	77.3	78.3	75.6	77.9	86.6	100.0	
15	55.7	53.5	52.4	53.8	52.9	52.7	51.8	52.4	51.5	51.3	51.3	50.0	74.1	52.4	100.0

^z 1. *Citrus x paradise* (AAK51545.1). 2. *Prunus armeniaca* (AAX33347.1). 3. *Tagetes erecta* (AAG10426.1). 4. *Momordica charantia* (AAR86105.1). 5. *Hydrilla verticillata* (AAT76434.1). 6. *Arabidopsis thaliana* (AAL15300.1). 7. *Nicotiana benthamiana* (ABE99707.1) 8. *Solanum tuberosum* (AAS17750.1). 9. *Gentiana lutea* (BAB82461.1). 10. *Daucus carota* (ABB52082.1). 11. *Oryza sativa* (AAD02489.1). 12. *Crocus sativus* (AAO24235.1). 13. *Coffea canephora* (ABC87739.1). 14. *Chrysanthemum x morifolium* (BAE79552.1). 15. *Mangifera indica* (This study)

1 MSLECFSSVSESAFNLRV-----GEKDSFPMGQSEK-I RVKTRTRK--
 1 MSQWACVSA--NLSQASLINTQKLRNTPRC-----DAFSEKGRFMAQSCRELSPQAI YGRF
 1 MSLES A-----TTESTHHS-----EHAHTI TAR-HREKPPFPPI SI AN-R
 1 MSLECGSVS--ALNLRWQKGS-----KPTSRCCSPLGCKKDAEAEWGRFVGDGKE-I SGRHVS
 1 MTVARSVVAYNESGLQNRYPASSSVS CFLGKEYR--C--NSMEGEC--GGKLAFGANAVYKAI
 1 MVVFGNVCANRVPYQNGFLEALS S G-----GCEMGHSFRVETSOALKT RT
 1 MP QI GLVSYAVNERVQGNSSAY-LWSRSS-LGTESQDVCLORNLCE--GS SDS MGHKRI
 1 MP QI GLVSYAVNERVQGNSSAY-LWSRSS-LGTESRDGLORNSCE--AGSES MGHKRI R--
 1 MSQEGHI SA VNI RQGNNAVLSWQSATGG-YRFCEQRNPRLL--RS SDVI SHKENI--
 1 MSH--HYSAYITNTYTNLNLHLLDKFPLSFSATLS TTKQQQ--QQHPLSRSTKETRTR
 1 MTASARYFAGQEP THR-----CFASSI QALKGQHVSVGKSLVLRNKGKRF
 1 MNEVGLVSYAS-----PTGETA-----QRKYEPFGAGSECLFCPEKFSVSS
 1 MMSSES GNVSALV-----STETS RDSI NITSSSS AKL-----SEGRADSI TGHQF
 1 MSFNLSLCSGAE-----MAEQSELMGXAI KHW-----KAT

Citrus × paradisi (AAK51545.1)
 Prunus armeniaca (AAK33347.1)
 Tagetes erecta (AAG10426.1)
 Momordica charantia (AAR86105.1)
 Hydrilla verticillata (AAT76434.1)
 Arabidopsis thaliana (AAL15300.1)
 Nicotiana benthamiana (ABE99707.1)
 Solanum tuberosum (AAS17750.1)
 Gentiana lutea (BAB82461.1)
 Daucus carota (ABB52082.1)
 Oryza sativa (AAD02489.1)
 Crocus sativus (AAO24235.1)
 Coffea canephora (ABC87739.1)
 Chrysanthemum × morifolium (BAE79552.1)
 Mangifera indica (This study)

39 -G--FCPSKVVCYDYPREDI DNTS NFEAAAYSSSFRTPSRPSPKPKKVVY AGAGLAGE
 59 NG--ACPELVVYDYPREDI DNTS NFEAAAYSSSFRTPSRPSPKPKKVVY AGAGLAGE
 41 R-----PKNVFCYDYPREDI DNTS NFEAAAYSSSFRTPSRPSPKPKKVVY AGAGLAGE
 62 EG--TLPEKVKCLDYPREDI DNTS NFEAAAYSSSFRTPSRPSPKPKKVVY AGAGLAGE
 66 PK--LRFKXNCGMDFRFDI DNTS NFEAAAYSSSFRTPSRPSPKPKKVVY AGAGLAGE
 48 KRS TAGFLQVYVDI PRPELNTVNFLEAASLSASFRS APRFAKPKKVVY AGAGLAGE
 68 KD--FNPKVYVCI DYPPELNTVNFLEAALSSSFRTPSRPSPKPKKVVY AGAGLAGE
 66 KD--LGPLKVVYCI DYPPELNTVNFLEAALSSSFRTPSRPSPKPKKVVY AGAGLAGE
 65 KR--ASPKVYVCI DYPPELNTVNFLEAAYSSSFRTPSRPSPKPKKVVY AGAGLAGE
 64 -----LKYS CYDYPREDI DNTLPFEAAAYSSSFRTPSRPSPKPKKVVY AGAGLAGE
 90 RRLG--ALQVYQDFRFPPEE NIT NFEAAAGLSSSFRTPSRPSPKPKKVVY AGAGLAGE
 49 KAGT--PKKVFCDYRPFEEES AVNFEAAQF SASFRS GRPDKGLQI VVAGAGLAGE
 1 -----I DYPPEEENAVNFEAAAYSSSFRTPSRPSPKPKKVVY AGAGLAGE
 59 RN--VTPEKVKCYDYPREDI DNTS NFEAAAYSSSFRTPSRPSPKPKKVVY AGAGLAGE
 33 PRSGYKPLQVACVYDYPREDI DNTS NFEAAAYSSSFRTPSRPSPKPKKVVY AGAGLAGE

Citrus × paradisi (AAK51545.1)
 Prunus armeniaca (AAK33347.1)
 Tagetes erecta (AAG10426.1)
 Momordica charantia (AAR86105.1)
 Hydrilla verticillata (AAT76434.1)
 Arabidopsis thaliana (AAL15300.1)
 Nicotiana benthamiana (ABE99707.1)
 Solanum tuberosum (AAS17750.1)
 Gentiana lutea (BAB82461.1)
 Daucus carota (ABB52082.1)
 Oryza sativa (AAD02489.1)
 Crocus sativus (AAO24235.1)
 Coffea canephora (ABC87739.1)
 Chrysanthemum × morifolium (BAE79552.1)
 Mangifera indica (This study)

106 PLEEARADVYGGKVAAWKDDGDDWYETGLHIFFGAYFNI QNLFGEELGIDNRLQWKEYS
 127 PLEEARADVYGGKVAAWKDDGDDWYETGLHIFFGAYFNI QNLFGEELGIDNRLQWKEYS
 106 PLEEARADVYGGKVAAWKDDGDDWYETGLHIFFGAYFNI QNLFGEELGIDNRLQWKEYS
 134 PLEEARADVYGGKVAAWKDDGDDWYETGLHIFFGAYFNI QNLFGEELGIDNRLQWKEYS
 134 PLEEARADVYGGKVAAWKDDGDDWYETGLHIFFGAYFNI QNLFGEELGIDNRLQWKEYS
 134 PLEEARADVYGGKVAAWKDDGDDWYETGLHIFFGAYFNI QNLFGEELGIDNRLQWKEYS
 134 PLEEARADVYGGKVAAWKDDGDDWYETGLHIFFGAYFNI QNLFGEELGIDNRLQWKEYS
 134 PLEEARADVYGGKVAAWKDDGDDWYETGLHIFFGAYFNI QNLFGEELGIDNRLQWKEYS
 127 PLEEARADVYGGKVAAWKDDGDDWYETGLHIFFGAYFNI QNLFGEELGIDNRLQWKEYS
 118 PLEEARADVYGGKVAAWKDDGDDWYETGLHIFFGAYFNI QNLFGEELGIDNRLQWKEYS
 118 PLEEARADVYGGKVAAWKDDGDDWYETGLHIFFGAYFNI QNLFGEELGIDNRLQWKEYS
 59 PLEEARADVYGGKVAAWKDDGDDWYETGLHIFFGAYFNI QNLFGEELGIDNRLQWKEYS
 127 PLEEARADVYGGKVAAWKDDGDDWYETGLHIFFGAYFNI QNLFGEELGIDNRLQWKEYS
 103 PLEEARADVYGGKVAAWKDDGDDWYETGLHIFFGAYFNI QNLFGEELGIDNRLQWKEYS

Citrus × paradisi (AAK51545.1)
 Prunus armeniaca (AAK33347.1)
 Tagetes erecta (AAG10426.1)
 Momordica charantia (AAR86105.1)
 Hydrilla verticillata (AAT76434.1)
 Arabidopsis thaliana (AAL15300.1)
 Nicotiana benthamiana (ABE99707.1)
 Solanum tuberosum (AAS17750.1)
 Gentiana lutea (BAB82461.1)
 Daucus carota (ABB52082.1)
 Oryza sativa (AAD02489.1)
 Crocus sativus (AAO24235.1)
 Coffea canephora (ABC87739.1)
 Chrysanthemum × morifolium (BAE79552.1)
 Mangifera indica (This study)

176 S--REDFEPELVPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA
 197 S--REDFEPELVPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA
 176 S--REDFEPELVPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA
 200 S--REDFEPELVPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA
 204 S--REDFEPELVPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA
 188 S--REDFEPELVPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA
 206 S--REDFEPELVPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA
 204 S--REDFEPELVPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA
 203 S--REDFEPELVPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA
 203 S--REDFEPELVPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA
 188 S--REDFEPELVPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA
 188 S--REDFEPELVPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA
 129 S--REDFEPELVPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA
 197 S--REDFEPELVPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA
 173 P ADLI EQKFLPAFLNGIWAELKNN--EMLTWPEKVKFATGLLPAI IGGQAYVEA

Citrus × paradisi (AAK51545.1)
 Prunus armeniaca (AAK33347.1)
 Tagetes erecta (AAG10426.1)
 Momordica charantia (AAR86105.1)
 Hydrilla verticillata (AAT76434.1)
 Arabidopsis thaliana (AAL15300.1)
 Nicotiana benthamiana (ABE99707.1)
 Solanum tuberosum (AAS17750.1)
 Gentiana lutea (BAB82461.1)
 Daucus carota (ABB52082.1)
 Oryza sativa (AAD02489.1)
 Crocus sativus (AAO24235.1)
 Coffea canephora (ABC87739.1)
 Chrysanthemum × morifolium (BAE79552.1)
 Mangifera indica (This study)

244 RVTTEVYF-IAMSKA-LNFI--NPDELS--MQCILLALNR--FLQEKHGSKMAFLDGNP
 265 RVTTEVYF-IAMSKA-LNFI--NPDELS--MQCILLALNR--FLQEKHGSKMAFLDGS
 244 RVTTEVYF-IAMSKA-LNFI--NPDELS--MQCILLALNR--FLQEKHGSKMAFLDGS
 268 RVTTEVYF-IAMSKA-LNFI--NPDELS--MQCILLALNR--FLQEKHGSKMAFLDGNP
 272 RVTTEVYF-IAMSKA-LNFI--NPDELS--MQCILLALNR--FLQEKHGSKMAFLDGNP
 256 RVTTEVYF-IAMSKA-LNFI--NPDELS--MQCILLALNR--FLQEKHGSKMAFLDGNP
 274 RVTTEVYF-IAMSKA-LNFI--NPDELS--MQCILLALNR--FLQEKHGSKMAFLDGNP
 271 RVTTEVYF-IAMSKA-LNFI--NPDELS--MQCILLALNR--FLQEKHGSKMAFLDGNP
 265 RVTTEVYF-IAMSKA-LNFI--NPDELS--MQCILLALNR--FLQEKHGSKMAFLDGS
 256 RVTTEVYF-IAMSKA-LNFI--NPDELS--MQCILLALNR--FLQEKHGSKMAFLDGNP
 197 RVTTEVYF-IAMSKA-LNFI--NPDELS--MQCILLALNR--FLQEKHGSKMAFLDGNP
 265 RVTTEVYF-IAMSKA-LNFI--NPDELS--MQCILLALNR--FLQEKHGSKMAFLDGS
 243 RVTTEVYF-IAMSKA-LNFI--NPDELS--MQCILLALNR--FLQEKHGSKMAFLDGS

Citrus × paradisi (AAK51545.1)
 Prunus armeniaca (AAK33347.1)
 Tagetes erecta (AAG10426.1)
 Momordica charantia (AAR86105.1)
 Hydrilla verticillata (AAT76434.1)
 Arabidopsis thaliana (AAL15300.1)
 Nicotiana benthamiana (ABE99707.1)
 Solanum tuberosum (AAS17750.1)
 Gentiana lutea (BAB82461.1)
 Daucus carota (ABB52082.1)
 Oryza sativa (AAD02489.1)
 Crocus sativus (AAO24235.1)
 Coffea canephora (ABC87739.1)
 Chrysanthemum × morifolium (BAE79552.1)
 Mangifera indica (This study)

309 GGEVRLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD
 330 GGEVRLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD
 309 GGOVRLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD
 333 GGEVRLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD
 337 GGOVRLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD
 321 GGEVRLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD
 339 GGOVRLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD
 337 GGOVRLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD
 336 GGEVRLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD
 330 GGEVRLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD
 321 GGEVRLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD
 321 GGEVRLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD
 262 GGRVHLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD
 330 GGOVRLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD
 313 GGEVRLNSRFOKLELNDGTVKNFLELTNGNVI DGDAYVY ATPVDI LKLLLPD

Citrus × paradisi (AAK51545.1)
 Prunus armeniaca (AAK33347.1)
 Tagetes erecta (AAG10426.1)
 Momordica charantia (AAR86105.1)
 Hydrilla verticillata (AAT76434.1)
 Arabidopsis thaliana (AAL15300.1)
 Nicotiana benthamiana (ABE99707.1)
 Solanum tuberosum (AAS17750.1)
 Gentiana lutea (BAB82461.1)
 Daucus carota (ABB52082.1)
 Oryza sativa (AAD02489.1)
 Crocus sativus (AAO24235.1)
 Coffea canephora (ABC87739.1)
 Chrysanthemum × morifolium (BAE79552.1)
 Mangifera indica (This study)

379	VI NI HI WF DRK LKNTYDHL LFS RSP LLS VYADM S L TCKE YYP NQ S M E L V F A P A E E W S C S D S E I I D A T	<i>Citrus × paradise</i> (AAK51545.1)
400	VI NVHI WF DRK LKNTYDHL LFS RSP LLS VYADM S V TCKE YYP NQ S M E L V F A P A E E W S C S D S E I I D A T	<i>Prunus armeniaca</i> (AAK33347.1)
379	VI NVHI WF DRK LKNTYDHL LFS RSP LLS VYADM S V TCKE YYP NQ S M E L V F A P A E E W A R S D S D I I D A T	<i>Tagetes erecta</i> (AAG10426.1)
403	VI NVHI WF DRK LKNTYDHL LFS RSP LLS VYADM S V TCKE YYP NQ S M E L V F A P A E E W S R S F S E I I D A T	<i>Momordica charantia</i> (AAR86105.1)
407	VI NVHI WF DRK LKNTYDHL LFS RSP LLS VYADM S V TCKE YYP NQ S M E L V F A P A E K W S C S D S E I I D A T	<i>Hydrilla verticillata</i> (AAT76434.1)
391	VI NVHI WF DRK LKNTYDHL LFS RSP LLS VYADM S L TCKE YYP NQ S M E L V F A P A E E W S R T D S D I I D A T	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AAL15300.1)
409	VI NVHI WF DRK LKNTS D N L L F S RSP LLS VYADM S V TCKE YYP NQ S M E L V F A P A E E W N R S D S E I I D A T	<i>Nicotiana benthamiana</i> (ABE99707.1)
407	VI NVHI WF DRK LKNTYDHL LFS RSP LLS VYADM S V TCKE YYP NQ S M E L V F A P A E E W S R S D S E I I D A T	<i>Solanum tuberosum</i> (AAS17750.1)
406	VI NI HI WF DRK LKNTYDHL LFS RSP LLS VYADM S V TCKE YYP NQ S M E L V F A P A E E W S R S D S E I I V E A T	<i>Gentiana lutea</i> (BAB82461.1)
400	VI NVHI WF DRK LKNTYDHL LFS RSP LLS VYADM S V TCKE YYP NQ S M E L V F A P A E E W S R S D S D I I D A T	<i>Daucus carota</i> (ABB52082.1)
391	VI NVHI WF DRK LKNTYDHL LFS RSP LLS VYADM S V TCKE YYP NQ S M E L V F A P A E E W V G R S D T E I E A T	<i>Oryza sativa</i> (AAD02489.1)
391	VI NVHI WF DRK LKNTYDHL LFS RSP LLS VYADM S V TCKE YYP NQ S M E L V F A P A E E W S C S D S E I I D A T	<i>Crocus sativus</i> (AAO24235.1)
332	VI NVHI WF DRK LKNTYDHL LFS RSP LLS	<i>Coffea canephora</i> (ABC87739.1)
400	VI NVHI WF DRK LKNTYDHL LFS RSP LLS VYADM S V TCKE YYP NQ S M E L V F A P A E E W S R S D S D I I D A T	<i>Chrysanthemum × morifolium</i> (BAE79552.1)
383	VI NVHI WF DRK LKNTYDHL LFS RSP L E R C - - - - - C T G L T N G P V T M V R K L E H N P L T Q P C E E V G F F A P R	<i>Mangifera indica</i> (This study)
449	MKE - - LAKLFPDEI S A D Q S KAKI E - - KYHVKT P R S V Y K T I P N C E F C R P L Q R S P L E G F Y L A G D Y T K Q K Y	<i>Citrus × paradise</i> (AAK51545.1)
440	LKE - - LAKLFPDEI A A D Q S KAKI E - - KYHVKT P R S V Y K T I P D C E F C R P L Q R S P L E G F Y L A G D Y T K Q K Y	<i>Prunus armeniaca</i> (AAK33347.1)
479	MS E - - E S R L F P D E I A A D Q S KAKI E - - KYHVKT P R S V Y K T I P D C E F C R P L Q R S P L E G F Y L A G D Y T K Q K Y	<i>Tagetes erecta</i> (AAG10426.1)
473	MVE - - LAKLFPDEI S A D Q S KAKI E - - KYHVKT P R S V Y K T I P D C E F C R P L Q R S P L E G F Y L A G D Y T K Q K Y	<i>Momordica charantia</i> (AAR86105.1)
477	MOE - - LAKLFPDEI S A D Q S KAKI E - - KYHVKT P R S V Y K T I P D C E F C R P L Q R S P L E G F Y L A G D Y T K Q K Y	<i>Hydrilla verticillata</i> (AAT76434.1)
461	MKE - - LAKLFPDEI S A D Q S KAKI E - - KYHVKT P R S V Y K T I P N C E F C R P L Q R S P L E G F Y L A G D Y T K Q K Y	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AAL15300.1)
479	MKE - - LAKLFPDEI S A D Q S KAKI E - - KYHVKT P R S V Y K T I P N C E F C R P L Q R S P L E G F Y L A G D Y T K Q K Y	<i>Nicotiana benthamiana</i> (ABE99707.1)
477	MKE - - L A T L F P D E I S A D Q S KAKI E - - KYHVKT P R S V Y K T I P G C E P C R P L Q R S P L E G F Y L A G	<i>Solanum tuberosum</i> (AAS17750.1)
476	MKE - - LAKLFPDEI S A D Q S KAKI E - - KYHVKT P R S V Y K T I P G T E P C R P L Q R S P L E G F Y L A G D Y T K Q K Y	<i>Gentiana lutea</i> (BAB82461.1)
470	MOE - - LAKLFPDEI S A D Q S KAKI E - - KYHVKT P R S V Y K T I P D C E F C R P L Q R S P L E G F Y L A G D Y T K Q R Y	<i>Daucus carota</i> (ABB52082.1)
461	MOE - - LAKLFPDEI S A D Q S KAKI E - - KYHVKT P R S V Y K T I P D C E F C R P L Q R S P L E G F Y L A G D Y T K Q K Y	<i>Oryza sativa</i> (AAD02489.1)
461	MKE - - LAKLFPDEI S A D Q S KAKI E - - KYHVKT P R S V Y K T I P D C E F C R P L Q R S P L E G F Y L A G D Y T K Q K Y	<i>Crocus sativus</i> (AAO24235.1)
359		<i>Coffea canephora</i> (ABC87739.1)
470	MS E - - E S R L F P D E I A A D Q S KAKI E - - KYHVKT P R S V Y K T I P D C E F C R P L Q R S P L E G F Y L A G D Y T K Q K Y	<i>Chrysanthemum × morifolium</i> (BAE79552.1)
446	S R N G F S A K R L R N N G C Y N E G A C K T E S G R N F C S S K Q S K N C Y V S - - - - - C C Y N A K V C V Q - - - - - D C P K L W T	<i>Mangifera indica</i> (This study)
514	EASMEGA - - - - VESGKLC AQAI VQDYELL AARGKGRLEAASM - - - - C	<i>Citrus × paradise</i> (AAK51545.1)
535	EASMEGA - - - - VESGKLC AQAI VQDYELLE VARGQTREAEASV - - - - R	<i>Prunus armeniaca</i> (AAK33347.1)
514	EASMEGA - - - - VESGKFCARAI VQDYELLEAAREKV - AEAASLV	<i>Tagetes erecta</i> (AAG10426.1)
538	EASMEGA - - - - VESGKLC AQAI VKDYEMVAREQRVAEAGY - - - - R	<i>Momordica charantia</i> (AAR86105.1)
542	EASMEGA - - - - VESGKLC AQAI VQDCSLEASRVQKSPQTLTI A	<i>Hydrilla verticillata</i> (AAT76434.1)
526	EASMEGA - - - - VESGKFC SQSIVQDYELLEASGP RRKES EATVS S - S	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AAL15300.1)
544	EASMEGA - - - - VESGKLC AQAI VQDYELLEGRS QKMAEASVSI VN	<i>Nicotiana benthamiana</i> (ABE99707.1)
534		<i>Solanum tuberosum</i> (AAS17750.1)
541	EASMEGA - - - - VESGKFC AQAI VQDYELLE RAGVRSKLEAAS - - - - I P N	<i>Gentiana lutea</i> (BAB82461.1)
535	EASMEGA - - - - VESGKLC AQAI LQDHESLESLRRKQVLEAATAV	<i>Daucus carota</i> (ABB52082.1)
526	EASMEGA - - - - VESGKLC AQASVVE DYKME SRRSLKS EQS E - - VPVAS	<i>Oryza sativa</i> (AAD02489.1)
526	EASMEGA - - - - VESGKLC AQAI VQDYELLEARS EKKPQPEMITI A	<i>Crocus sativus</i> (AAO24235.1)
359		<i>Coffea canephora</i> (ABC87739.1)
535	EASMEGA - - - - VES E K F C AQAI VQDYELLE VARGE V - I AEAASLV	<i>Chrysanthemum × morifolium</i> (BAE79552.1)
504	ES S P AKI SNRM E F S WGLHKTE VS GFNGRCS VVRKA E C S S YCTGL	<i>Mangifera indica</i> (This study)

圖 6. 14 個不同植物與愛文芒果之 PDS 胺基酸序列之排序比較。

Fig. 6. Comparison of PDS amino acid sequences of 14 plant species and mango ‘Irwin’. Blue shade indicates the same amino acids, boxes are different amino acids and dashes(-) are residues which losing comparing with consensus sequence.

愛文芒果果實發育期類胡蘿蔔素總量之變化

愛文芒果的花朵與果實在發育後期均表現為黃色，組織內含有豐富類胡蘿蔔素。在果實發育過程中，若以遮光紙袋進行套袋則果皮顏色從綠色轉變為黃色，若以透光紙袋進行套袋則果皮顏色轉變為紅色，但是無論套袋與否或紙袋種類為何，果肉顏色終將由無色轉變為黃顏色。在果實發育初期 (stage 1)，總類胡蘿蔔素含量為 10.44 ± 0.33 mg/kg Fwt，而在果實完熟後 (stage 6) 總類胡蘿蔔素含量為 130.29 ± 7.76 mg/kg Fwt，總共增加 12.5 倍之多，特別是當果實發育生理成熟期 (stage 5) 後，開始進行內容物轉換時，類胡蘿蔔素的含量會開始大量累積 (34.90 ± 1.77 mg/kg Fwt)，此時期的胡蘿蔔素含量約為前面幾個時期的 3 倍量 (stage 2、3 及 4 分別為 11.33 ± 0.52 ; 10.17 ± 1.18 ; 13.17 ± 1.55 mg/kg Fwt)，而到完熟時 (stage 6) 類胡蘿蔔素得

累積達到最高量，並使果肉呈現漂亮的鮮黃顏色。若與葉片所累積的類胡蘿蔔素量相比較。因為葉片需要進行光合作用，而類胡蘿蔔素最主要之功能為保護葉綠素免於光氧化之破壞，因此在芒果成熟葉片中類胡蘿蔔素總量 (440.40 ± 3.94 mg/kg Fwt) 較成熟果實高約 3.5 倍 (圖 7)。

愛文芒果 PDS 基因在果實發育過程中的表現

利用芒果 *PDS* 專一性引子，對不同芒果發育時期的果肉部分進行基因相對表現量之檢測，PCR 循環次數在 32 次至 36 次之間，PCR 產物在 EthBr 染色下，呈現線性關係，顯示該循環次數內之 DNA 擴增成指數成長。經電泳後以 *actin* 基因擴增條帶亮度為對照，計算其相對表現量，結果顯示在不同的果實發育時期，*PDS* 基因均有表現，表現幅度呈現微幅變動但逐漸減少之趨勢。當果實直徑大小為 3 cm (stage 1) 時是表現量最高的時期，此時期相對表現量平均達 119.6%；果實大小為 5 cm (stage 2)，該基因表現呈現下滑情形，平均相對表現量平均為 105.5%；果實大小為 7 cm (stage 3)，該基因平均相對表現量為 90.8%；果實大小為 9 cm (stage 4)，該基因之平均相對表現量約略上升為 106.9%，與 stage 2 相當，仍低於第 1 時期。在果實綠熟的第 5 時期，呈現略微下降趨勢，平均相對表現量為 102.4%，而果實黃熟的第 6 時期，*PDS* 平均相對表現量則降為 99.3% (圖 8)。雖然各時期的基因表現呈現變動之趨勢，其變化幅度並不大，也未在果實轉色前才大量表現該基因，不論是哪一个發育時期的果實，其 *PDS* 表現量均較葉片的平均相對表現量 176.1% 為低。

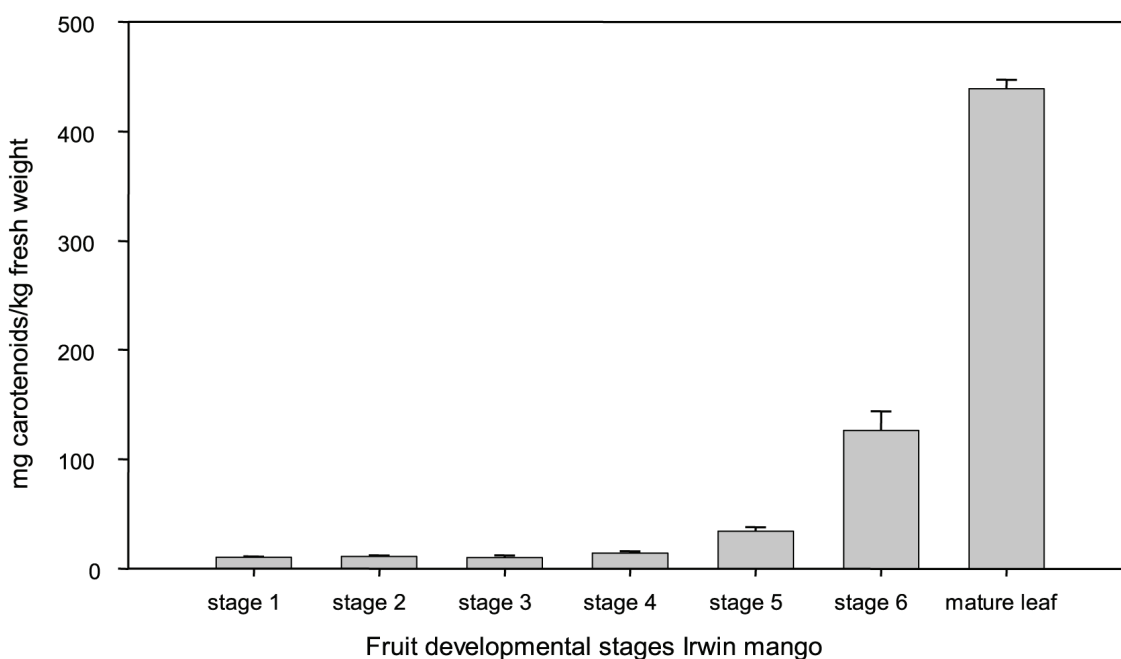


圖 7. 愛文芒果不同發育時期果實與葉片總類胡蘿蔔素含量。

Fig. 7. Carotenoid (mg/ kg Fwt) in mature leaves and fruits of mango 'Irwin' at six development stages.

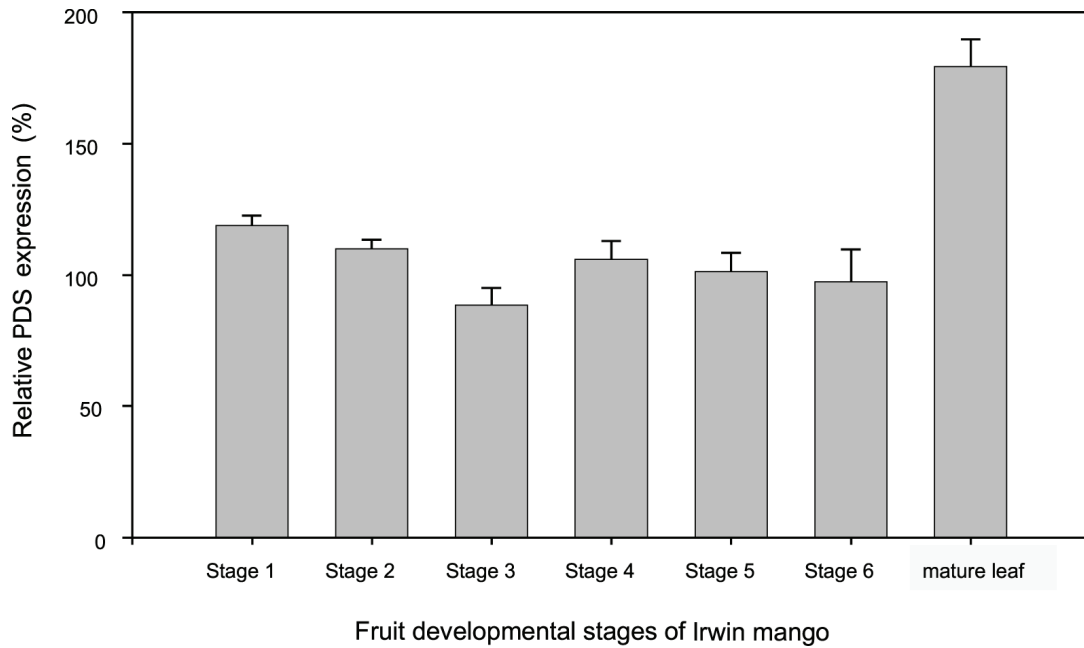


圖 8. 愛文芒果不同發育時期 *PDS* 基因與 *actin* 基因之相對表現量。

Fig. 8. Relative qPCR analysis of *PDS* expression in mango fruits at six development stages and mature leaves. Actin gene was used as an internal control.

討 論

芒果是熱帶地區重要的果樹，具有香甜的風味，特別是鮮黃的果肉更是吸引人。芒果果實的顏色由累積類胡蘿蔔素而得，主要的胡蘿蔔素種類為 all-trans- β -carotene, all-trans-violaxanthin 及 9-cis-violaxanthin (Mercadante *et al.* 1997)。在愛文芒果果實成熟過程中，類胡蘿蔔素總含量會隨著發育時期而增加，然而在果實發育到生理成熟期前，增加的幅度並不明顯，至果實達到生理成熟期後，果肉顏色才會漸漸轉變成黃色，此時類胡蘿蔔素總量快速增加，果肉也轉成鮮黃色。愛文芒果幼果 (stage1) 與成熟果 (stage 6) 的總胡蘿蔔素含量分別為 10.44 mg/kg Fwt 與 145.28 mg/kg Fwt，且在果實發育達到生理成熟期後 (stage 5) 才開始快速累積類胡蘿蔔素，愛文芒果在果實達生理成熟期以後才開始大量累積總類胡蘿蔔素的模式與番茄相似 (Fraser *et al.* 1994)，也與龍膽花、萬壽菊花朵發育後期才快速累積類胡蘿蔔素的模式一致 (Zhu *et al.* 2004; Moehs *et al.* 2001)。雖然不同植物花朵與果實的類胡蘿蔔素累積方式相似，但是最終的類胡蘿蔔素含量增加的倍率卻有相當大的差異，龍膽花發育初期與後期的類胡蘿蔔素相差僅 2 倍，而萬壽菊相差可達 100 倍 (Zhu *et al.* 2004; Moehs *et al.* 2001)，本研究中愛文芒果在果實發育初期與後期的類胡蘿蔔素含量可以相差達 12.5 倍。

為瞭解愛文芒果 *PDS* 在果實發育至成熟期的基因表現方式，本研究利用 cDNA 端點快速擴增法，選殖一個在果實表現影響類胡蘿蔔素生合成的關鍵基因 *PDS*，其 cDNA 全長為 1,882 bp，含有

一個長達 1,644 bp 的解讀框架，可轉譯成 548 個胺基酸，5' 端末轉譯區 36 bp 與黑藻 (AY669082.1) 的 6 bp 及萬壽菊 (AF251014.1) 的 70 bp 同屬較短的 5' 端末轉譯區。其他如柑橘類 5' 端末轉譯區約為 150 bp，如葡萄柚 (AF364515.1) 柳橙 (AJ319761.1)，龍膽花 (AB028665) 為 133 bp。3' 端轉譯區在已經發表之植物中，柳橙、溫州蜜柑及萬壽菊等為 120 至 151 bp，而龍膽花、黑藻及阿拉伯芥 (NM117498.3) 則分別為 305、255 及 314 bp，本研究對象之 3' 端末轉譯區為 202 bp，介於中間值。DNA 序列比對分析的結果顯示該基因與其他植物物種具有 60–68% 的相似性，顯然該基因的核酸變動頗多，胺基酸序列的相似度則為 50.0% 至 74.1%，胺基酸的一致性序列則集中在中間區域。靠近前端的 38 個胺基酸與靠近後端的 140 個胺基酸變化較大，PDS 的高保守區域位於胺基酸序列之中間區域。

類胡蘿蔔素合成相關基因在不同植物、不同組織間的表現情形具有差異性。對於番茄而言，花朵在授粉後 *PDS* 的表現量比花盛開時增加 10 倍以上 (Fraser *et al.* 1994)，而龍膽花及辣椒花朵上類胡蘿蔔素合成的 *GGPP* 合成酵素在果實成熟過程隨著果實發育逐漸增加表現量，其基因表現為正調節模式。但是在水仙花朵中另一個胡蘿蔔素合成基因 *PSY* 的表現情形卻隨著花朵開放而明顯降低 (Zhu *et al.* 2004)，其基因表現模式為負調節模式。另外，在萬壽菊花朵的研究結果卻顯示總類胡蘿蔔素累積量與 *PSY* 及 *PDS* 基因表現量無正相關，認為此兩基因的表現量非胡蘿蔔素累積的主要因素 (Moehe *et al.* 2001)。筆者研究文心蘭花朵開放過程中花色與文心蘭 *PDS* 基因的表現，結果亦顯示文心蘭花朵黃色的表現主因為葉綠素降解，而非胡蘿蔔素的增加 (尚未發表)。番茄果實 *PYS* 與 *PDS* 基因表現量在授粉後分別增加 20 及 3 倍，認為此兩個基因在逆境及果實發育過程中的調控由不同機制所控制 (Giuliano *et al.* 1993)。Moehe *et al.* (2001) 於不同品種萬壽菊上的研究結果顯示，不同品種萬壽菊花朵之類胡蘿蔔素累積量可以相差達 100 倍，然而其合成早期基因之表現量卻僅相差數倍，說明類胡蘿蔔素的累積並非單純由這些早期合成基因所完全掌控，其基因表現與類胡蘿蔔素的累積為複雜之調控方式。在本研究中愛文芒果類胡蘿蔔素早期合成基因 *PDS* 的表現情形及總類胡蘿蔔素類的累積與番茄 (Fraser *et al.* 1994) 及木瓜果實的表現模式一致 (Skelton *et al.* 2006)。在類胡蘿蔔素合成過程中，光質與光線強度也會影響類胡蘿蔔素合成基因的表現情形 (Welsch *et al.* 2000; Simkin *et al.* 2003)。一般而言，光線可增加許多植物 phytoene synthase mRNA 的轉錄 (Bartley & Scolnik 1993; Simkin *et al.* 2003)。而其他類胡蘿蔔素合成基因的過度表現會顯現出回饋抑制作用 (feedback inhibition)，因而減緩其基因的表現程度，例如，phytoene desaturase and *z*-carotene desaturase 終產物的累積，會因為此兩個基因大量表現而被抑制 (Fraser *et al.* 1999)。此外，針對木瓜 Kapoho Solo 品種果實中 lycopene β -cyclase 基因在果實發育過程中的表現，隨著果實的發育，*LCY-B* 基因的表現會略為減少，呈現負向的調節作用 (Skelton *et al.* 2006)，本研究中，芒果果實 *PDS* 基因的表現模式可以類比木瓜 *LCY-B* 基因的表現方式。

本研究的結果顯示愛文種芒果不同發育時期 *PDS* 相對表現量並未隨著芒果果實發育而增加，特別是當果實達生理成熟期後開始大量累積類胡蘿蔔素，此時期 *PDS* 基因表現量卻反而降低，此與番茄 *PDS*、*LCY-B* 基因、木瓜 *LCY-B* 基因在果實發育過程中的調節方式相似 (Fraser *et al.* 1999; Skelton *et al.* 2006)，顯示了該基因在愛文芒果果實發育過程中亦為負調節模式。

水果的果皮色與果肉色為貿易與銷售上一個重要的指標，其中類胡蘿蔔素的含量與種類不僅影響果品的顏色，並與營養成分有密切關連，因此格外受到重視，芒果的果肉色也受到許多消費者的

注目，因此研究其果實後熟過程中顏色的變化與相關基因的表現情形具有重大意義。芒果的果肉色表現由類胡蘿蔔素而來，而類胡蘿蔔素生合成相關基因的研究，一直受到科學家們的重視，原因不外是因其抗氧化、人體必須營養元素、抗癌與保健等因素，在不同的作物及部分微生物中相關基因也已經被選殖並應用，例如將胡蘿蔔素生合成途徑的基因導入水稻創造的黃金米，受到世人的注意。然而由於不同物種對不同核酸序列的偏好性會造成轉基因作物表現情形的差異，因此對於將來需要進行轉基因的作物，確實有必要從該作物中選殖或直接修改該基因以求得轉基因作物最佳的表現，本研究首度自芒果中選殖到完整的類胡蘿蔔素生合成基因 *PDS* 並對其基因結構與胺基酸序列進行分析，亦研究其在不同果實發育時期基因表現程度，闡述了愛文芒果果實發育分子層次的研究成果。

誌 謝

本試驗研究經費承行政院農業委員會補助及試驗期間鳳山熱帶園藝試驗分所同仁張鳳娥小姐、張鳳琴小姐及林承志先生盡心協助試驗工作，特此致謝。

引用文獻 (Literature cited)

- Bartley, G. E. and P. A. Scolnik. 1995. Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* 7:1027–1038.
- Bramley, P. 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* 53:2107–2113.
- Fraser, P. D., M. R. Truesdale, C. R. Bird, W. Schunch, and P. M. Bramley. 1994. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Evidence for tissue-specific gene expression. *Plant Physiol.* 105:405–413.
- Fraser, P. D., J. W. Kiano, M. R. Truesdale, W. Schuch, and P. M. Bramley. 1999. Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Mol. Biol.* 40:687–698.
- Giuliano, G., G. E. Bartley, and P. A. Scolnik. 1993. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* 5:379–387.
- Klauri, H. and Bauernfeld, J. C. 1981. Carotenoids as colorants and vitamin A precursors: Technological and nutritional applications (Bauernfeind, J. C., ed.) Academic Press, New York, NY. 47–317 pp.
- Leblanc, C., A. Falciatore, M. Watanabe, and C. Bowler. 1999. Semi-quantitative RT-PCR analysis of photoregulated gene expression in marine diatoms. *Plant Mol. Biol.* 40:1031–1044.
- Li, L., D. J. Paolillo, M. V. Parthasarathy, E. M. DiMuzio, and D. F. Garvin. 2001. A novel gene mutation that confers abnormal patterns of β -carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *Plant J.* 26:59–67.

- Lichtenthaler, H. K. and A. R. Wellburn. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11:591–592.
- Mercadante, A. Z., D. B. Rodriguez-Amaya, and G. Britton. 1997. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. *J. Agric. Food Chem.* 45:120–123.
- Moehs, C. P., L. Tian, K. W. Osteryoung, and D. DellaPenna. 2001. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Mol. Biol.* 45:281–293.
- Sandmann, G. 2001. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch. Biochem. Biophys.* 385:1, 4–12.
- Simkin, A. J., A. M. Laboure, M. Kuntz, and G. Sandmann. 2003. Comparison of carotenoid content, gene expression and enzyme levels in tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves. *Z. Naturforsch.* 58:371–380.
- Skelton, R. L., Q. Yu, R. Srinivasan, R. Manshardt, P. H. Moore, and R. Ming. 2006. Tissue differential expression of lycopene β -cyclase gene in papaya. *Cell Res.* 16:731–739.
- Vishnevetsky, M. 1999. Molecular mechanisms underlying carotenogenesis in the chromoplast: Mutilevel regulation of carotenoid associated genes. *Plant L.* 20:423–431.
- Welsch, R., P. Beyer, P. Huguency, H. Kleinig, and J. von Lintig. 2000. Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* 211:845–854.
- Zhu, C. F., S. Yamamura, H. Koiwa, M. Nishihara, and G. Sandmann. 2002. cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea*. *Plant Mol. Biol.* 48:277–285.
- Zhu, C. F., X. Chen, and Y. D. Wang. 2004. Carotenoid biosynthesis in plants and application of its relative genes in gene engineering. *J. Plant Physiol. Mol. Biol.* 30:609–618.

Cloning of Phytoene Desaturase Gene in Mango (*Mangifera indica* L. cv. Irwin) and Its Expression at Different Stages of Fruit Development¹

Wen-Li Lee², Kuo-Dung Chiou², Rong-Quey Lin², Fure-Chyi Chen^{3,4}

Abstract

Lee, W. L., K. D. Chiou, R. Q. Lin, and F. C. Chen. 2008. Cloning of phytoene desaturase gene in mango (*Mangifera indica* L. cv. Irwin) and its expression at different stages of fruit development. *J. Taiwan Agric. Res.* 57:213–229.

Mango (*Mangifera indica*) is a tropical fruit containing carotenoids. In order to understand the expression of phytoene desaturase (*PDS*), a key enzyme for the biosynthesis of β -carotene, during fruit development, we have cloned and characterized a cDNA encoding *PDS* from young mango fruits, cv. Irwin. Mango *PDS* cDNA contains 1,882 bp, with 1,644 bp open reading frame encoding for a polypeptide of 548 amino acid residues. The 5' and 3' untranslated regions (UTR) were 36 bp and 202 bp, respectively. The deduced amino acid sequence of this *PDS* has 50.0–74.1% of similarity to *PDS* from other plant species. The relative expression levels and carotenoids content of the Irwin mango *PDS* at the six fruit development stages and in mature leaves were detected. The result showed that the expression level of *PDS* gene at different fruit development stages was reduced and the carotenoids increased rapidly, when fruit are maturing. These findings suggest that mango *PDS* is down regulated during the fruit ripening process.

Key words: Mango, *Mangifera indica*, Carotenoids, Phytoene desaturase, Gene cloning, Gene expression .

-
1. Contribution No.2329 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: September 10, 2008.
 2. Respectively, Assistant Horticulturist, Assistant Horticulturist, Associate Horticulturist, Feng-Shan Tropical Horticultural Experiment Branch, ARI, Feng-Shan, Taiwan, ROC.
 3. Professor, Institute of Plant Science, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, ROC.
 4. Corresponding author, e-mail: fchen@mail.npust.edu.tw; Fax: (08)7740371.